

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.004

文章编号: 1005-8982 (2019) 07-0018-06

塞来昔布联合培美曲塞对人肺腺癌 A549 细胞株增殖、凋亡及 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的影响

叶玉兰, 刘单, 邓述恺

(西南医科大学附属医院 呼吸与危重症医学一科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨塞来昔布 (Cele) 联合培美曲塞 (Pem) 对人肺腺癌 A549 细胞株增殖、凋亡的影响及其可能的机制。**方法** 分别采用不同浓度的 Cele 和 Pem 作用于 A549 细胞, 48 h 条件下, CCK-8 法检测光密度 (OD) 值, 计算半抑制浓度 (IC_{50}) 作为后续实验的药物浓度; 实验分组: 对照组 (加入培养液) 和实验组 (分别加入 IC_{50} 浓度的 Cele、 IC_{50} 浓度的 Pem、 IC_{50} 浓度的 Cele+Pem); Cele、Pem 单独用药或者联合用药在不同时间条件下 (24、36 和 48 h) 作用于 A549 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖, 择最佳作用时间作为后续实验的干预时间, 金氏法评估两药之间的相互关系, 流式细胞仪检测细胞凋亡及周期分布, Western blotting 检测 AKT、p-AKT 蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较, Cele 和 Pem 组呈浓度依赖性抑制 A549 细胞的增殖, 但低浓度 Cele 组 ($5 \mu\text{mol/L}$) 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Cele IC_{50} 值为 $30.51 \mu\text{mol/L}$, Pem IC_{50} 值为 $1.33 \mu\text{mol/L}$; 与对照组比较, Cele 和 Pem 组呈时间依赖性抑制 A549 细胞增殖, 且 Cele+Pem 组效果最佳。最佳干预时间为 48 h, Cele 与 Pem 联合抑制 A549 细胞增殖; Cele+Pem 组与对照组、Cele 组及 Pem 组比较, Cele+Pem 组细胞凋亡率和 G0/G1 期细胞比例升高, p-AKT/GAPDH 值下调 ($P < 0.05$), 而 AKT/GAPDH 值各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** Cele 与 Pem 联合可抑制 A549 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与诱导细胞 G0/G1 期阻滞及抑制 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 AKT 活性相关。

关键词: 肺肿瘤; A549/细胞; 塞来昔布/处方药; 培美曲塞/处方药; PI3K/AKT/信号传导

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of Celecoxib combined with Pemetrexed on proliferation, apoptosis and PI3K/AKT signaling pathway-related proteins in human lung adenocarcinoma A549 cells

Yu-lan Ye, Dan Liu, Shu-kai Deng

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of Celecoxib (Cele) and Pemetrexed (Pem) on human lung adenocarcinoma A549 cell line and possible mechanism. **Methods** A549 cells were treated with different concentrations of Celecoxib or Pemetrexed for 48 h. Half concentration (IC_{50}) was determined. A549 cells were treated with Celecoxib or Pemetrexed for 24 h, 36 h and 48 h to determine optimal concentration to inhibit the growth of cancer cells. Further cancer cells were treated with Celecoxib or Pemetrexed under optimal concentration and time of duration. Cell proliferation were identified by CCK-8 assay. Cell apoptosis and cycle distribution were

收稿日期: 2018-10-07

[通信作者] 邓述恺, E-mail: dsk_lan@163.com

determined by Flow Cytometry. Western blot was performed to detect the expression of AKT and p-AKT protein. Kim's method was applied for determination of crosstalk between the two drugs. **Results** Compared with the control group, proliferation of A549 cells was inhibited by Celecoxib or Pemetrexed in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). IC_{50} of Celecoxib and Pemetrexed was 30.51 $\mu\text{mol/L}$ and 30.51 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with the control group, Celecoxib and Pemetrexed showed inhibition of cellular proliferation of A549 cells in time-dependent manner ($P < 0.05$), and the optimal intervention time was 48 h. Celecoxib and Pemetrexed could synergistically inhibited proliferation of A549 cells. Compared with the other groups, Apoptotic rate and G0/G1 phase cell ratio were increased while the p-AKT was down-regulated significantly in treatment of Celecoxib and Pemetrexed when compared with those in control group, Cele group or Pem group ($P < 0.05$). **Conclusions** Celecoxib combined with Pemetrexed inhibits the proliferation while promotes the apoptosis of A549 cells, which may be related to the induction of cell G0/G1 phase arrest and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway.

Keywords: lung neoplasms; a549/cell; Celecoxib/prescription drug; Pemetrexed/prescription drug; PI3K/AKT/ signal conduction

选择环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂塞来昔布 (Celecoxib, Cele) 具有抗炎、解热、镇痛作用。近年来大量研究发现, Cele 对包括肺癌^[1]在内的多种恶性肿瘤均表现出抗癌活性^[2-3], 但具体机制尚未完全明确。培美曲塞 (Pemetrexed, Pem) 是一种多靶点的抗叶酸化疗药物, 被推荐用于非鳞非小细胞肺癌的一线治疗^[4]。磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 家族是一类重要激酶, 而蛋白激酶 B (protein kinase, B) 是 PI3K 信号通路的核心靶点。PI3K/AKT 通路广泛存在真核细胞中, 与细胞生长、增殖、分化调节密切相关^[5]。本实验拟通过 Cele、Pem 单药和联合用药与人肺癌 A549 细胞共培养, 研究 Cele 与 Pem 联合对肺癌细胞的增殖、凋亡的影响, 并初步探讨其可能的作用机制, 以期为临床肺癌化疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

A549 细胞株 (西南医科大学中心实验室), Cele (上海阿拉丁生化科技股份有限公司), Pem (美国 Selleck 生物科技有限公司), CCK-8 检测试剂盒、细胞凋亡及周期检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), HyClone 改良型 RPMI 1640 培养基 (北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司), BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (武汉阿斯特生物技术有限公司), 兔抗人 AKT 一抗及 p-AKT 一抗 (美国 CST 公司), 内参 GAPDH 抗体 (英国 Abcam 公司), 山羊抗兔二抗 (南非 Aspen 公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞复苏、培养及传代 将 A549 细胞株培养

于 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中, 置于 5% 二氧化碳 CO_2 、37℃、恒温培养箱内, 贴壁生长至 85% 时用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 CCK-8 法检测不同浓度下细胞组增殖抑制率和光密度 (OD) 值 将 A549 细胞接种于 96 孔板, 温育 24 h, 加入 Cele (0.5、10、20、40 及 80 $\mu\text{mol/L}$), Pem (0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 及 8.0 $\mu\text{mol/L}$) 后继续培养 48 h, CCK-8 法检测 OD 值, 并计算半抑制浓度 (IC_{50}) 用于后续实验的药物浓度。

1.2.3 CCK-8 法检测各实验组细胞增殖抑制率 将 A549 细胞接种于 96 孔板, 分为对照组 (加入培养液) 和实验组, 实验组又分为 Cele 组 (加入 IC_{50} 浓度的 Cele)、Pem 组 (加入 IC_{50} 浓度的 Pem)、Cele+Pem 组 (加入 IC_{50} 浓度的 Cele 和 Pem), 每组设 5 个复孔。37℃ 5% CO_2 培养箱中分别培养 24、36 和 48 h 取出, 加入 CCK-8 试剂, 孵育 4 h。酶标仪测量 450 nm 波长处的 OD 值, 计算增殖抑制率。结合前期预实验, 48 h 增殖抑制效果最佳, 择其作为后续药物实验干预时间。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 A549 细胞接种于 6 孔板, 分组同 1.2.3 部分, 室温孵育 48 h, 收集细胞; 加入 300 μl Binding Buffer 悬浮细胞; 加入 5 μl Annexin V-FITC, 混匀, 避光孵育 10 min, 再加入 5 μl PI, 混匀, 避光孵育 5 min, 上机检测。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期分布 将 A549 细胞接种于 6 孔板, 分组同 1.2.3, 室温孵育 48 h, 收集细胞, PBS 洗 3 次, 加入预冷的 70% 乙醇, 4℃ 固定过夜。收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 加入 500 μl RNase/PI 重悬细胞, 避光染色 20 min, 上机检测。

1.2.6 Western blotting 检测 AKT、p-AKT 蛋白水平 将 A549 细胞接种于 96 孔培养板, 分组同 1.2.3, 室温孵育 48 h, 裂解液裂解细胞后提取总蛋白。BCA 法检

测蛋白浓度, 制定标准曲线, 计算各组蛋白浓度。凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭, AKT 及 p-AKT 一抗 4℃ 过夜, TBST 洗膜, 加二抗, 洗膜, ECL 发光剂显影, 拍照。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用重复测量设计的方差分析, 两组比较采用 LSD-*t* 检验, 方差齐性检测采用 Levene 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。金氏法评价两药联合的相互关系, 计算公式: Q 值 = $EA + B / (EA + EB - EA \times EB)$ 。结果判读: 若 Q 值 < 1 , 两药之间相互拮抗; Q 值 = 1, 两药之间作用相加; Q 值 > 1 , 两药之间相互协同。所有实验过程均重复 3 次。

2 结果

2.1 不同浓度 Cele 和 Pem 单药对 A549 细胞增殖的抑制作用及 IC_{50}

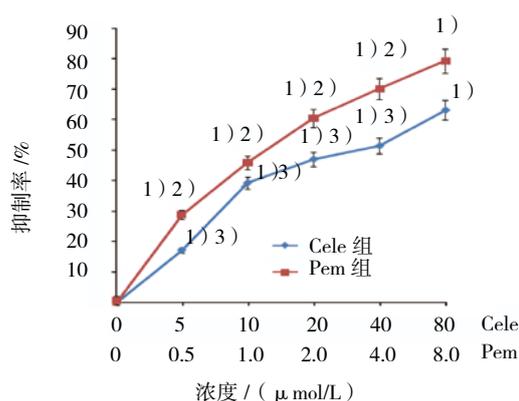
浓度为 5、10、20、40 及 80 $\mu\text{mol/L}$ Cele 干预组细胞增殖抑制率分别为 $(17.300 \pm 3.988)\%$ 、 $(39.504 \pm 1.656)\%$ 、 $(47.236 \pm 1.895)\%$ 、 $(51.662 \pm 5.387)\%$ 和 $(63.379 \pm 1.986)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 133.341$, $P = 0.000$), 随着药物浓度增加, 各组细胞增殖抑制率逐渐上升, 但低浓度 Cele (5 $\mu\text{mol/L}$) 抑制作用与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0 及 8.0 $\mu\text{mol/L}$ Pem 干预组细胞生长抑制率分别为 $(28.976 \pm 3.483)\%$ 、 $(46.072 \pm 1.249)\%$ 、 $(60.735 \pm 2.892)\%$ 、 $(70.359 \pm 3.886)\%$ 和 $(79.545 \pm 2.531)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 230.315$, $P = 0.000$), 随着药物浓度增加, 各组细胞增殖抑制率逐渐上升。实验得知 Cele IC_{50} 值为 30.51 $\mu\text{mol/L}$, Pem IC_{50} 值为 1.33 $\mu\text{mol/L}$ 。见图 1。

2.2 Cele 联合 Pem 对 A549 细胞增殖的抑制作用

IC_{50} 浓度条件下, 各实验组与对照组作用于 A549 细胞 24、36 和 48 h 对 A549 细胞增殖抑制作用比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞增殖抑制率有差异 ($F = 1107.544$, $P = 0.000$); ②两组细胞的增殖抑制率有差异 ($F = 149.865$, $P = 0.000$); ③两组的增殖抑制变化趋势有差异 ($F = 2291.635$, $P = 0.000$)。见表 1。

2.3 金氏法评价 Cele 联合 Pem 对 A549 细胞增殖抑制作用

Cele 联合 Pem 与 A549 共培养 48 h, Q 值为 1.001,



1) 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $P < 0.05$; 2) 与 Cele 80 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 Pem 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$

图 1 不同浓度 Cele 和 Pem 作用于 A549 细胞 48 h 的增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

约等于 1, 说明 Cele 与 Pem 联合干预体外培养的 A549 细胞增殖。

2.4 Cele 联合 Pem 对 A549 细胞凋亡的影响

作用于 A549 细胞 48 h 条件下, 对照组、Cele 组、Pem 组及 Cele+Pem 组细胞凋亡率分别为 $(2.900 \pm 0.900)\%$ 、 $(10.190 \pm 1.778)\%$ 、 $(11.813 \pm 0.846)\%$ 和 $(24.630 \pm 0.252)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 208.388$, $P = 0.000$); 各实验组细胞凋亡率与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 均有所上升; Cele+Pem 组细胞凋亡率与 Cele 组、Pem 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Cele+Pem 组细胞凋亡率增加; 而 Cele 组细胞凋亡率与 Pem 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组 A549 细胞周期分布情况

作用于 A549 细胞 48 h 条件下, 对照组、Cele 组、Pem 组及 Cele+Pem 组 G0/G1 分别为 $(52.487 \pm 0.267)\%$ 、 $(65.393 \pm 0.368)\%$ 、 $(65.577 \pm 0.064)\%$ 和 $(75.143 \pm 0.778)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 1270.915$, $P = 0.000$); 与对照组比较, 各实验组 G0/G1 细胞比例均增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Cele+Pem 组细胞 G0/G1 细胞比例与 Cele 组、Pem 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Cele+Pem 组增加; 而 Cele 组 G0/G1 细胞比例与 Pem 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.6 Cele+Pem 对 A549 细胞 AKT、p-AKT 蛋白表达的影响

作用于 A549 细胞 48 h 条件下, 对照组、Cele 组、Pem 组及 Cele+Pem 组 p-AKT/GAPDH 值分别为

表 1 Cele、Pem 单药和联合用药不同时间条件下对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h		36 h		48 h	
	OD 值	抑制率 /%	OD 值	抑制率 /%	OD 值	抑制率 /%
对照组	0.994 ± 0.013	-	1.038 ± 0.039	-	1.158 ± 0.047	-
Cele 组	0.816 ± 0.004	18.311 ± 0.431 ¹⁾²⁾	0.701 ± 0.010	32.314 ± 1.011 ¹⁾²⁾⁵⁾	0.581 ± 0.048	49.743 ± 4.186 ¹⁾⁵⁾
Pem 组	0.805 ± 0.007	19.510 ± 0.678 ¹⁾	0.665 ± 0.015	35.513 ± 1.474 ¹⁾⁵⁾	0.588 ± 0.023	49.192 ± 1.778 ¹⁾⁵⁾
Cele+Pem 组	0.724 ± 0.005	26.755 ± 0.554 ¹⁾³⁾⁴⁾	0.443 ± 0.018	57.098 ± 1.785 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	0.320 ± 0.037	72.370 ± 3.232 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 Pem 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 Pem 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 Cele 组比较, $P < 0.05$; 5) 与 24 h 比较, $P < 0.05$

(0.544 ± 0.033)、(0.267 ± 0.042)、(0.157 ± 0.014) 和 (0.063 ± 0.021), 4 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 148.409, P = 0.000$); 对照组、Cele 组、Pem 组及 Cele+Pem 组 AKT/GAPDH 值分别为 (0.684 ± 0.054)、(0.656 ± 0.025)、(0.673 ± 0.021) 和 (0.648 ± 0.011), 4 组比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.748, P = 0.553$);

与对照组比较, p-AKT/GAPDH 值在 Cele 组、Pem 组及 Cele+Pem 组均下调 ($P < 0.05$), 且 Pem 组 p-AKT/GAPDH 值低于 Cele 组 ($P < 0.05$), Cele+Pem 组 p-AKT/GAPDH 值与 Cele 组和 Pem 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3 ~ 5。

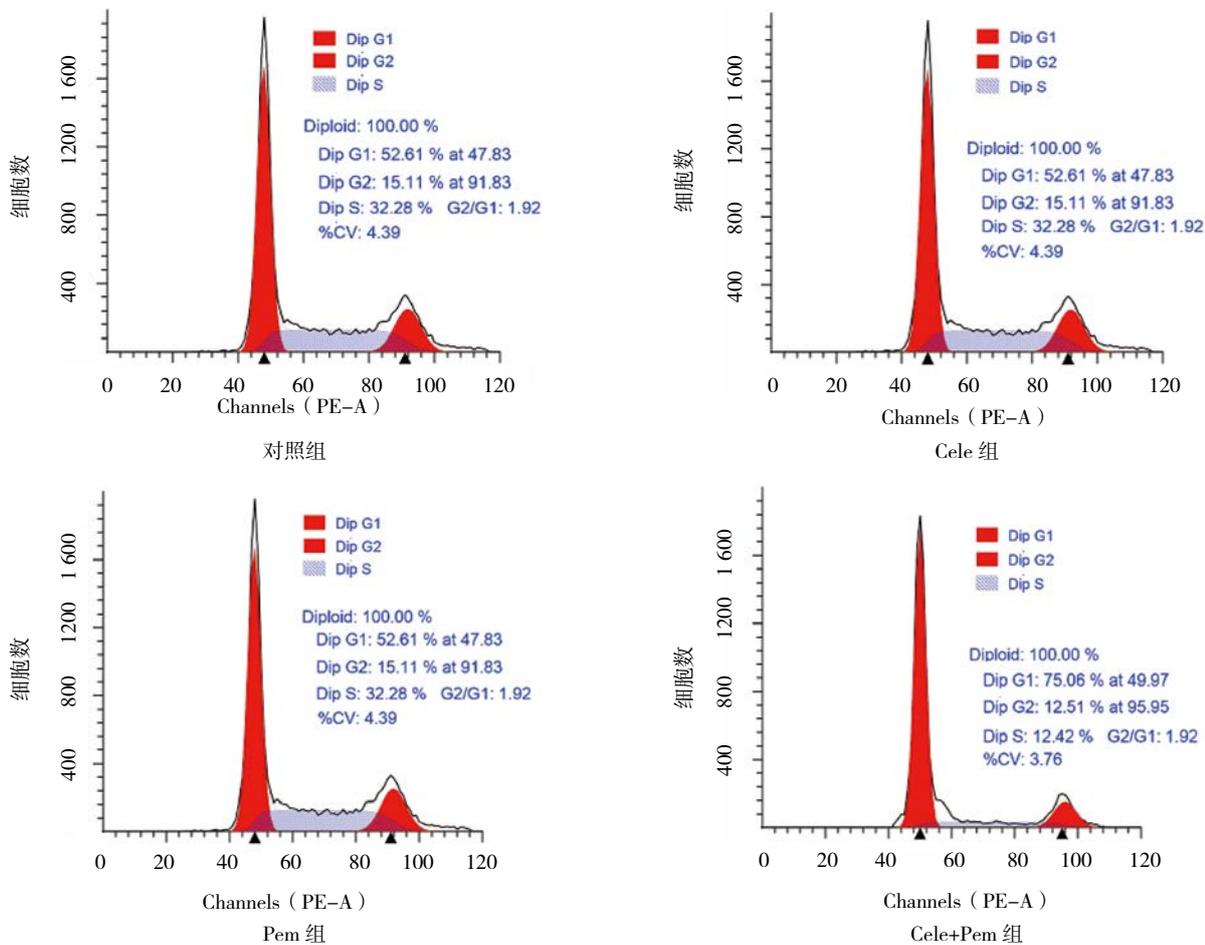
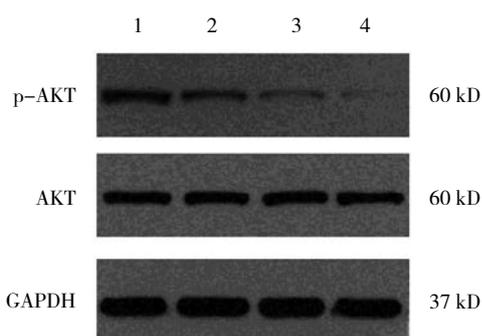
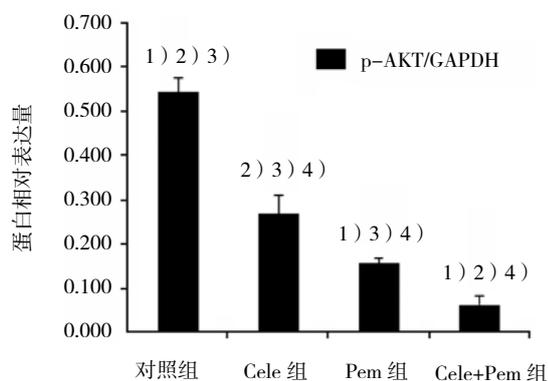


图 2 各组 A549 细胞周期分布情况



1: 对照组; 2: Cele 组; 3: Pem 组; 4: Cele+Pem 组

图 3 A549 细胞中 p-AKT 及 AKT 蛋白的表达



1) 与 Cele 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 Pem 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 Cele+Pem 组比较, $P < 0.05$; 4) 与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 A549 细胞中 p-AKT 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

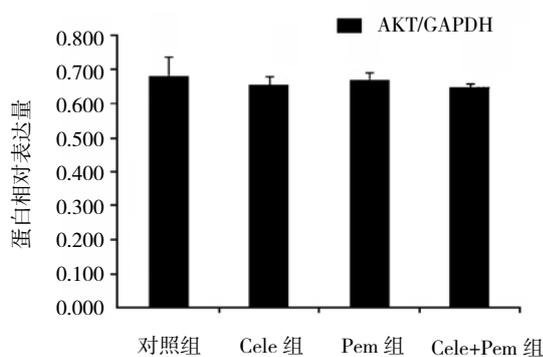


图 5 A549 细胞中 AKT 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

选择 COX-2 抑制剂 Cele, 具有抗炎、解热、镇痛作用, 近年来大量研究发现, Cele 对包括肺癌在内的多种恶性肿瘤均表现出抗癌活性^[1-3], 其可能的机制为: 阻断细胞周期进展, 抑制细胞增殖及血管生成, 诱导细胞凋亡^[6-7]; 抑制癌细胞浸润及转移^[8-9] 相关。KIM 等^[10] 研究发现, Cele 能够触发内质网应激, 诱导人非小细胞肺癌细胞系 A549 和 H460 细胞凋亡。

ZHANG 等^[11] 分别用 Cele 和 XIAP-shRNA 单独或联合作用于 A549 细胞, 发现各实验组增殖率均表现出下降, 细胞凋亡上升。CAI 等^[12] 报道, 当 Cele 作用于体外孵育的 A549, G0/G1 期细胞群由 41.2% 增至 60.5%, 从而认为 Cele 能够诱导 G0/G1 期停滞, 影响细胞周期进展, 在 H1299 细胞株中也得到相似结果。与该结果类似, 本实验结果表明, 较高浓度 Cele (10、20、40 及 80 $\mu\text{mol/L}$) 可抑制 A549 细胞的增殖和活力, 但低浓度 Cele (5 $\mu\text{mol/L}$) 抑制作用与对照组比较, 差异无统计学意义。另外与对照组比较, Cele 能够增加 A549 细胞 G0/G1 期比例。

某项荟萃分析报道^[13], Cele 联合化疗可以显著改善晚期 NSCLC 治疗的总体有效率。本实验通过使用 Cele、Pem 单药和联合作用于体外培养的 A549 细胞, 结果显示, 与对照组比较, Cele、Pem 均呈浓度依赖性抑制 A549 细胞增殖, 且在 IC_{50} 浓度条件下, Cele、Pem 呈一定时间依赖性抑制 A549 细胞增殖, Cele+Pem 组抑制作用最强; 各实验组 A549 细胞凋亡率及 G0/G1 期细胞比例均有不同程度升高。WU 等^[14] 分析 Pem 与作用于 A549 细胞 24 及 48 h 后细胞周期分布情况, 发现其呈剂量及时间依赖性诱导 G1 期阻滞, 另有学者报道^[15], 将 PC9 细胞同时暴露于 Pem 和吉非替尼将导致明显 G1 阻滞, 本实验结果与之类似。金氏法显示 Cele 联合 Pem 作用于 A549 48 h, Q 值为 1.001, 说明两者联合对 A549 细胞增殖抑制起到相加作用, Cele 能增强 Pem 抗肿瘤效应。

真核细胞中广泛存在 PI3K/AKT 信号通路, 原癌蛋白 AKT 被认为是 PI3K 下游中心效应分子, 参与细胞生长、增殖、分化的调节。PI3K 能够通过 AKT 将细胞分裂信号向下游传递, 调控细胞周期蛋白 D 表达, 通过周期蛋白 D1-CDK4-Rb 调控细胞周期, 从而影响细胞增殖^[16-18]。此外, p-AKT 能使 Bcl-2 (抗凋亡蛋白) 从聚合体中释放出来, 从而发挥抗凋亡作用。据报道, Cele 可抑制前列腺癌 PC-3 细胞株中 p-AKT 的表达, 从而诱导细胞凋亡^[19]; 在非小细胞肺癌中, 研究者发现放疗可以促进 A549 细胞中 p-AKT 的表达, 而与各对照组相比, 厄洛替尼 + Cele 联合放疗组 p-AKT 表达水平最低, 从而认为厄洛替尼联合 Cele 可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路增强放疗的抗肿瘤效果^[20]。以上研究提示 AKT 可能是 Cele 的作用靶点之一。本实验结果还发现, 与对照组比较, Cele+Pem 组 p-AKT 蛋白表达下降, 而 AKT 蛋白表达水平组间差异无统计学意义。表明 AKT/p-AKT 至少部分参与了 Cele 与 Pem

联合抗肿瘤的过程。

本研究表明, Cele 可增强 Pem 抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖、诱导细胞凋亡作用, 其机制可能与诱导细胞周期 G0/G1 期阻滞, 抑制 PI3K/AKT 通路相关蛋白 AKT 活性相关。其联合应用有望成为治疗 NSCLC 的有效策略, 但尚需进一步体内实验及相关临床试验进行验证。

参 考 文 献:

- [1] YOKOUCHI H, KANAZAWA K, ISHIDA T, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors for non-small-cell lung cancer: a phase II trial and literature review[J]. *Molecular and Clinical Oncology*, 2014, 2(5): 744-750.
- [2] FRIEDRICH M, REICHERT K, WOESTE A, et al. Effects of combined treatment with vitamin d and cox2 inhibitors on breast cancer cell lines[J]. *Anticancer research*, 2018, 38(2): 1201-1207.
- [3] SATO A, MIZOBUCHI Y, NAKAJIMA K, et al. Blocking COX-2 induces apoptosis and inhibits cell proliferation via the Akt/survivin- and Akt/ID3 pathway in low-grade-glioma[J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2017, 132(2): 231-238.
- [4] MASTERS G A, TEMIN S, AZZOLI C G, et al. Systemic therapy for stage iv non-small-cell lung cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline update[J]. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2015, 33(30): 3488-3515.
- [5] LIM H J, CROWE P, YANG J L. Current clinical regulation of PI3K/PEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(4): 671-689.
- [6] XIAO Y T, LUO L M, ZHANG R. Effect of lentivirus mediated cyclooxygenase-2 gene shorthairpinRNA on invasiveness of endometrial carcinoma[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2015, 36(1): 44-48.
- [7] THILL M, WOESTE A, REICHERT K, et al. Vitamin D inhibits ovarian cancer cell line proliferation in combination with celecoxib and suppresses cyclooxygenase-2 expression[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(2): 1197-1203.
- [8] JUNG I, GURZU S, TURDEAN S, et al. Relationship of endothelial area with VEGF-A, COX-2, maspin, c-KIT, and DOG-1 immunoreactivity in lipo-sarcomas versus non-lipomatous soft tissue tumors[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1776-1782.
- [9] CHRISTODOULIDIS G, TSILIONI I, SPYRIDAKIS M E, et al. Matrix metalloproteinase-2 and-9 serum levels as potential markers of intraperitoneal adhesions[J]. *J Invest Surg*, 2013, 26(3): 134-140.
- [10] KIM B, KIM J. Celecoxib induces cell death on non-small cell lung cancer cells through endoplasmic reticulum stress[J]. *Anatomy & Cell Biology*, 2017, 50(4): 293-300.
- [11] ZHANG H, LI Z, WANG K. Combined treatment of XIAP-targeting shRNA and celecoxib synergistically inhibits the tumor growth of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Oncology Reports*, 2015, 33(3): 1079-1088.
- [12] CAI F, CHEN M, ZHA D, et al. Curcumol potentiates celecoxib-induced growth inhibition and apoptosis in human non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115526-115545.
- [13] HOU L C, HUANG F. Does celecoxib improve the efficacy of chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2016, 81(1): 23-32.
- [14] WU D M, ZHANG P, XU G C, et al. Pemetrexed induces G1 phase arrest and apoptosis through inhibiting Akt activation in human non small lung cancer cell line A549[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015, 16(4): 1507-1513.
- [15] WU M, YUAN Y, PAN Y Y. Combined gefitinib and pemetrexed overcome the acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(2): 931-938.
- [16] LI J, LAIN Y, CAO Y, et al. SHARPIN overexpression induces tumorigenesis in human prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via NF- κ B/ERK/Akt signaling pathway[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(2): 444.
- [17] LIU Y, CHEN Y Y, CAO J Y, et al. Oxidative stress, apoptosis, and cell cycle arrest are induced in primary fetal alveolar type II epithelial cells exposed to fine particulate matter from cooking oil fumes[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22(13): 9728-9741.
- [18] LU Z, ZHOU R, KONG Y, et al. S-equol, a secondary metabolite of natural anticancer isoflavone daidzein, inhibits prostate cancer growth in vitro and in vivo, though activating the AKT /FOXO3a pathway[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2016, 16(5): 455-465.
- [19] KULP S K, YANG Y T, HUNG C C, et al. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(4): 1444-1451.
- [20] SUN J, LIU N B, ZHUANG H Q, et al. Celecoxib-erlotinib combination treatment enhances radiosensitivity in A549 human lung cancer cell[J]. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 2017, 19(1): 45-50.

(张西倩 编辑)